

分裂中期的CHO细胞能对其染色体 DNA 进行切除修补吗?

贾先礼 郑德存 陈去恶

(中国科学院生物物理研究所)

摘 要

以中国仓鼠细胞 CHO-K₁ 为材料, 用放射自显术检查紫外线照射后细胞内 DNA 的切除修补, 没有得到足以证明分裂中期细胞对其染色体 DNA 进行切除修补的可靠证据。此结果与 1977 年 Ikushima 所报告的不同。对于这种修补能力的缺乏, 作者认为应考虑到的原因至少有: (1) 分裂中期染色体上的 DNA 处在高度紧密的状态, 难于进行切除修补; (2) 分裂中期细胞中担任 DNA 修补合成的多聚酶 β 的活性可能下降; (3) 分裂中期细胞的核膜解体。

一、引 言

自 1966 年 Mc Grath 和 Williams 发现大肠杆菌能对其受 X 射线打断的 DNA 主链进行重接修补以来, 许多工作者陆续对各种细菌和真核细胞作了不少 DNA 修补问题的研究, 取得了多方面的重大进展。这些实验结果使人们越来越深刻地认识到, 细胞对 DNA 的修补作用, 在生物学及医学上具有非常重要的意义。

本文探讨处在分裂中期的哺乳类细胞, 能否对其染色体上受损伤的 DNA 进行切除修补 (excision repair) 的问题。1977 年 Ikushima 首先报告, 处在分裂中期的中国仓鼠细胞 CHO, 会对其受紫外线损伤的染色体 DNA 进行切除修补, 但是迄今还没有见到能够证实或否定的新报导。按一般科学惯例, 这个问题是不能说已有定论, 还需要更多的工作来加以验证。

二、材料与方 法

(1) 样品制备: 由我院遗传研究所提供的中国仓鼠细胞 CHO-K₁, 在 199 培养基 (加小牛血清 20%) 中生长两或三天, 然后参考 Stubblefield 和 Klevecz (1965) 的方

法收集分裂中期细胞, 换上含秋水仙胺 ($0.06 \mu\text{g/ml}$) 的培养基, 在 37°C 继续保温两小时, 使更多细胞被强制停留在分裂中期; 将培养瓶放在桌面上水平地摇动三分钟 (每分钟约 180 次), 使中期细胞从瓶壁上脱落下来, 可得到 20%~70% 的中期细胞。用含秋水仙胺的 PBS 洗, 并制成细胞悬液, 每毫升含细胞约 10^5 个。

(2) 紫外线照射: 每样品取悬液 3 ml, 在直径 6 mm 的无盖培养皿中受紫外线照射, 每照射到预定时间的一半, 重新摇匀一次, 然后照完全程。照射源是北京灯泡厂制的 20 瓦灭菌灯, 注明波长为 2537 埃, 不加滤光器, 与样品垂距 45 cm*。

(3) 照后修补保温: 照后离心 8 分钟 (800 转/分), 去掉 PBS, 将细胞重悬于含秋水仙胺及 $^3\text{H-T}_d\text{R}$ ($1 \mu\text{Ci/ml.}$) 的 199 培养基中, 移入培养瓶, 在 37°C 保温两小时。 $^3\text{H-T}_d\text{R}$ 可在细胞进行切除修补时掺入到其 DNA 中。

为避免细胞发生光复活作用 (photoreactivation), 自紫外线照射时起, 至保温完毕止, 操作均在暗室中进行。

(4) 放射自显影及观察: 保温后离心收集细胞, 用预先在 37°C 保温的含秋水仙胺的 199 培养基洗两次, 用预先在 37°C 保温的 1/4 浓度的 PBS 作低渗处理 10 分钟 (以上每次清洗和处理后均进行离心收集); 用 1:3 的冰醋酸—甲醇混合液固定, 离心收集, 涂片, 在空气中干燥。用“核 4”乳胶涂膜, 在冰箱中曝光三天, 用 D_{19} 在 18°C 显影两分钟, 用 F_4 定影 15 分钟; 洗净后用醋酸地衣红染色。用油镜在同一张片上分别计数非分裂细胞核中和中期细胞染色体上的银粒数; 每组观察展开、清晰的中期细胞 100 个, 非分裂细胞 200 个。

三、结 果

(1) 未受照非分裂细胞核的标记情况: 图 1 显示, 对照组 (未受照) 非分裂细胞核受标记的百分数曲线右方上升, 在每核银粒 150 个以上之处出现高峰, 还有少数核内银粒密集成团无法计数, 显然这是部份细胞的 S 期有不同长度时间被包括在保温的 2 小时之内的结果, 反映 DNA 的正常复制合成。在每核 6—60 个银粒这一段保持较平稳的最低值。有相当部份 (平均 28.9%) 的细胞核未见标记银粒。有一部份 (平均 21.7%) 细胞核内银粒数在 5 以下, 估计这种标记主要是由于本底辐射、乳胶质量以及细胞在保温期间内可能发生的 DNA 自然转换 (turnover) 所引起的, 作为“自然本底”看待更合适。

(2) 紫外线对细胞 DNA 正常复制合成的抑制作用: 从图 1 可以见到, 受照射各组细胞核标记比例曲线与对照组比较起来, 右方的峰都由 150 以上银粒处左移到 61—100 个银粒处, 且未见银粒密集成团的细胞核, 显然这是 DNA 正常复制部份地受紫外线抑制的结果。

(3) 非分裂细胞能对其 DNA 进行切除修补, 我们对图 1 所示的实验结果作以下分析: (a) 受照各组中不受标记的细胞核比例数下降; 如将每核银粒数为 0 和 1~

* 我们以粗略的方法计算, 剂量率可能为 $40 \text{ J/M}^2/\text{分}$, 作为选择照射时间的参考。

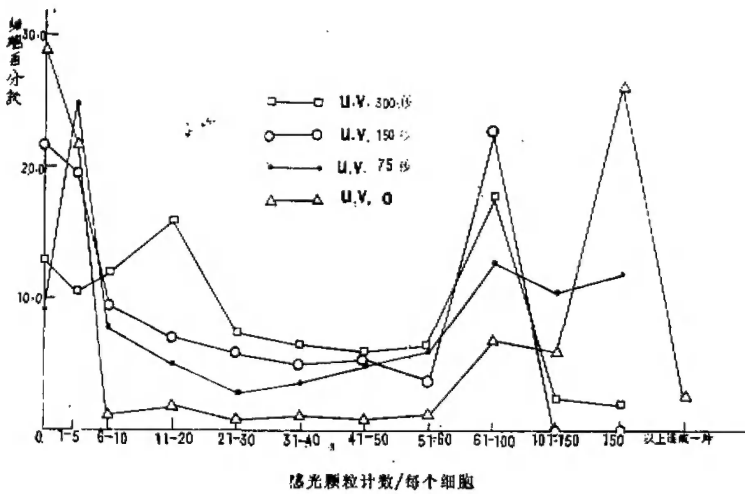


图1 非分裂的CHO-K₁细胞受紫外线照射并保温两小时后的³H-T_dR标记情况

5的比例数加在一起,与对照组比较,可见到照射后此段的总比例数减少,显然这部分是右移到6~60个银粒的一段中去。照射5.0, 2.5及1.25分钟的三组右移的百分数分别为27.3, 9.6及16.7。(b)在6~60个银粒的一段中,三个照射组的比例数曲线都比对照组高($P < 0.01$);将它们减去此段内对照组的本底数,剩下各组照后提高的数,再分别减去可能代表DNA复制合成受抑的左移来的数*,得到三个可以代表切除修补的数(它们恰与上述右移来的数相等)。然后分别计算这些可代表切除修补的数,在该段照后提高的数中所占比例**,照射5.0, 2.5及1.25分钟的组分别为0.578, 0.334及0.708。以上表明非分裂的CHO-K₁细胞受紫外线照射后,确有切除修补能力。

(4)处在分裂中期的细胞对其染色体DNA进行切除修补的能力近于没有或极其微弱,观察中期细胞是计数每个细胞的全部染色体(含DNA量4n)上的银粒总数。从表1可以见到,凡是在固定之前的实验过程(包括照射、保温等)被秋水仙胺约束在中期的细胞,没有一个的标记银粒达到11个以上。这一点与其对照组是相同的,而与受照射的非分裂细胞(图1)比较起来,³H-T_dR的掺入程度低得多。

在每个细胞银粒数为1~5个和6~10个的两“点”上,受照的中期细胞比例数比对照组的。将各种不同剂量的照射组的细胞放在一起,与全部对照组进行比较,则在1~5个的“点”上的差异有统计学显著性($P < 0.025$),6~10个的“点”上尚未得到显著性($P < 0.1$)。如果将1~5个及6~10个银粒处的细胞百分数放在一起进行统计处理,则与对照组间没有显著性差异($P > 0.5$)。

* 以对照组每该61个以上银粒的细胞比例总数,分别减去各照射组同一段的细胞比例总数即得。

** 如为1,表明全是切除修补来的,无左移来的;如为0,表明全是左移来的,无切除修补;如为正小数,则表明切除修补及左移的两者都有。

表 1 处在分裂中期的 CHO-K₁ 细胞受紫外线照射并保温两小时后的 ³H-T_dR 标记情况

实验类别	紫外线照射 时间 (秒)	标 记 的 中 期 细 胞 百 分 数				观察细胞总数
		0 ^a	1—5	6—10	11—	
A	300	11.5	79.5	9.0	0	200
	0	41.0	56.5	2.5	0	200
B	150	5.0	84.5	10.5	0	200
	0	30.0	64.0	6.0	0	200
C	75	21.0	74.5	4.5	0	200
	0	33.0	65.5	1.5	0	200
D	38	23.5	75.3	1.2	0	400
	0	27.8	72.2	0	0	400
平均百分数	照 射	15.25 ± 14.69	78.45 ± 8.06 ^b	6.30 ± 3.40 ^c	0	1,000
	不 照 射	32.95 ± 9.90	64.55 ± 11.31	2.50 ± 1.68	0	1,000

a. 每个细胞银粒数 b. $p < 0.025$ c. $p > 0.1$

以上表明, 处在分裂中期的细胞几乎没有对其染色体 DNA 进行切除修补的能力, 如果有, 也是极其微弱的。

四、讨 论

Ikushima 所报导的处在分裂中期的 CHO 细胞, 对其染色体上受紫外线损伤的 DNA 的切除修补能力是相当大的, 在每条最大的染色体上可以见到的平均银粒数就有 5.12 颗, 次大的染色体有 3.72 颗, 小的染色体有 0.86 颗, 不照射的对照组则没有明显的银粒; 我们在分裂中期的 CHO-K₁ 细胞上所见的结果与此则很不相同, 切除修补能力极微弱或几乎没有。要追究其原因我们认为至少可以从以下三个方面来考虑:

(1) 分裂中期染色体上的 DNA 是处在高度紧密的状态, 难于进行切除修补。

(2) 分裂中期细胞的 DNA 多聚酶 β 的活性可能较低: 据一些文献报导 (Keir et al. 1977, Hubscher et al 1978), 哺乳类细胞中的 DNA 多聚酶 β 是 DNA 切除修补过程中进行期外合成的主要酶, 虽然一般认为它在细胞内的活性是较为稳定的, 但 1975 年 Ooka 和 Daillie 用同步化的 KB 细胞进行实验的结果却表明自 S 期中段至下一个 G₁ 期之间, 其活性是连续下降的。

(3) 分裂中期核膜解体: 分裂中期的细胞没有核膜。虽然我们还没有见到关于真核细胞核膜在 DNA 修补过程中起什么作用的报导。但是根据细菌上的研究结果, 我们认为目前不能排除核膜解体对真核细胞 DNA 修补作用的可能影响。Jacob 指出, 细菌染色体与其质膜之间有一个接触点, 该处存在有复制所需的酶, DNA 在该处复制。Myers 报告, 当大肠杆菌 B/r 受 X 射线照射时, 如果质膜受到敏化剂产生的碘原子自由

基的进攻,会使照后重接修补DNA能力全部消失。同样真核细胞核膜与染色体之间也有许多接触点, (Franke 1977, Zbarsky, 1978), 尽管关于DNA复制时是否由接触点开始的问题尚有争论, 但核膜与DNA修补作用之间的关系还是值得考虑和探讨的。

参 考 文 献

- Franke, W. W. 1977 Structure and function of nuclear membranes. in "Biochemistry of the cell nucleus" (Biochem. soc. symp. No. 42; Garland, P. B., and Mathias, A. P., eds.) The Biochemical Society, London; pp. 125—135.
- Hubscher, U., Kuenzle, C. C., Limacher, W., Scherrer, P., and Spadari, S. 1978 Functions of DNA polymerases α , β , and γ in neurons during development. Cold spring harbor symp. quant. biol., Vol. 43 (pt. 1) pp. 625—629.
- Ikushima, T. 1977 Distribution of UV-induced unscheduled DNA synthesis in metaphase chromosomes of chinese hamster cells. *Exp. Cell Res.*, 108: 444—447.
- Jacob, F. 1966 Genetics of the bacterial cell. *Science*, 152: 1470—1478.
- Keir, H. M., Craig, R. K., and McLennan, A. G. 1977 Variation of deoxyribonucleic acid polymerases in cell cycle. in "Biochemistry of the cell nucleus" (Biochem. soc. symp. No. 42; Garland, P. B., and Mathias, A. P., eds.) The Biochemical Society, London; pp. 37—54.
- McGrath, R. A., and Williams, R. W. 1966 Reconstruction in vivo of irradiated *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid; the rejoining of broken pieces *Nature*, 212: 534—535.
- Myers, D. K. 1971 DNA repair in *E. coli* B/r after X-irradiation in the presence of iodide or iodoacetamide. *Internat. J. Rad. Biol.*, 19: 293—295.
- Ooka, T., and Daillie, J. 1975 Studies on changes in DNA polymerase activity during cell cycle in synchronized KB cells. *Biochimie*, 57: 235—246.
- Stubblefield, E., and Klevecz, R. 1965 Synchronization of chinese hamster cells by reversal of colcemid inhibition. *Exp. Cell Res.*, 40: 660—664.
- Zbarsky, I. B. 1978 An enzyme profile of the nuclear envelope. *Internat. Rev. Cytol.*, 54: 295—360.

COULD CHO CELL IN METAPHASE FULFIL THE EXCISION REPAIR ON ITS CHROMOSOMAL DNA?

Jia Xianli, Zheng Decun and Chen Que

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing, China)

CHO-K₁ cells were blocked at metaphase by colcemid, UV-irradiated, incubated in medium 199 containing ³H-T_dR and colcemid, and then observed by autoradiography. The authors found no convincing evidences to prove that the excision repair occurs in the DNA of metaphase chromosomes. This result is different from that of Ikushima (1977, Exp. Cell Res., 108, 444). The possible causes related to such repair deficiency were suggested as follows: (1) High condensation of the DNA in metaphase chromosome; (2) low activity of DNA polymerase β (which is known as the main repair polymerase), and (3) disintegration of nuclear envelope during metaphase.